



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0114140
(43) 공개일자 2017년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/282 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/282 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0041399

(22) 출원일자 2016년04월05일

심사청구일자 2016년04월05일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이원섭

경상남도 진주시 진주대로 789, 102동 802호 (주약동, 한보은빛마을아파트)

김혜정

경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 102동 602 (주약동, 삼환나우빌)

신성철

경상남도 진주시 진양호로97번길 19-6, 101동 609호 (평거동, 한보타운)

(74) 대리인

한윤호

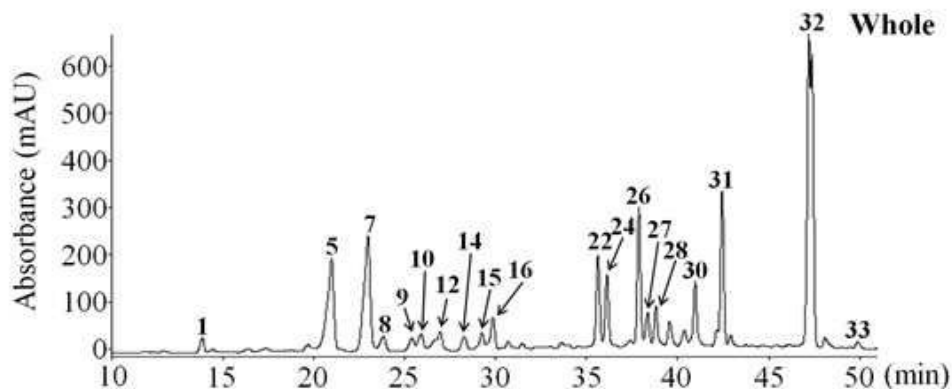
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 개똥쑥으로부터 분리된 폴리페놀을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물로부터 분리된 폴리페놀 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 31/192 (2013.01)

A61K 31/7048 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0820050

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 국립암센터

연구사업명 암정복추진연구개발사업

연구과제명 암의 예방 및 치료율 향상을 위한 연구 기반 구축

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2008.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물로부터 분리된 폴리페놀 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 개똥쑥 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알콜, 주정 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴리페놀 혼합물은 개똥쑥 조직을 파쇄하여 제조된 분말에 에탄올을 처리하여 추출하고 상기 추출물을 농축한 후 초산에틸로 추출하여 제조되는, 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폴리페놀 혼합물은 카페산(caffeic acid), 퀘르세틴-3-O-갈락토시드(quercetin-3-O-galactoside), 메아르세틴-글루코시드(mearnsetin-glucoside), 캠프페롤-3-O-글루코시드(kaempferol-3-O-glucoside), 퀘르세틴-3-O-글루코시드(quercetin-3-O-glucoside), 페룰산(ferulic acid), 이소람네틴-글루코시드(isorhamnetin-glucoside), 디오스메틴-7-O-D-글루코시드(diosmetin-7-O-D-glucoside), 루테올린-7-O-글루코시드(luteolin-7-O-glucoside), 퀘르세틴(quercetin), 퀘르세틴-3-O-메틸 에테르(quercetagetin-3-O-methyl ether), 루테올린(luteolin), 8-메톡시-캠프페롤(8-methoxy-kaempferol), 퀘르세타게틴-5,3-di-O-메틸 에테르(quercetagetin-5,3-di-O-methyl ether), 캠프페롤(kaempferol), 3,5-디히드록시-6,7,4'-트리메톡시플라본(3,5-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone), 3,5-디히드록시-6,7,3',4'-테트라메톡시플라본(3,5-dihydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone) 및 이소람네틴(isorhamnetin)을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 암은 자궁경부암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부 흑색종, 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 뇌종양, 방광암, 혈액암, 위암, 항문부근암, 유방암, 나팔관암 종 또는 자궁내막암종인, 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물로부터 분리된 폴리페놀 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 개똥쑥으로부터 분리된 폴리페놀을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 의학의 발전과 함께, 노인 인구의 폭발적인 증가에 따라 노인 암환자 또한 증가할 것으로 예상되는 가운데 이러한 노인 인구에서 장기 저장(organ reservoir)의 부족으로 인해 치료 관련 사망이 증가하고 있고 전통적인 화학요법제의 사용으로 인한 심각한 부작용이 종종 발생하기도 한다. 게다가, 현대 화학요법제의 전략은 항암화학요법으로 치료하는 암환자의 삶의 질에 비중을 두고 있기 때문에 식이성 작용제(dietary agents)로서 심각한 독성없이 안전하게 항암 효과를 강화할 수 있는 피토케미컬(phytochemical)에 많은 관심이 집중되고 있다. 이러한 이유로 종래 잘 알려진 개똥쑥을 이용한 항암 효과를 나타내는 생리활성 물질 연구가 활발하게 진행되고 있다. 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)은 국화과에 속하는 일년생 초본으로 열대 아시아 원산으로 우리나라를 비롯한 세계적으로 분포하고 있으며, 한방에서는 개똥쑥의 지상부를 해열제, 지혈제, 피부병 치료제, 살충제 등으로 사용하고 있다. 특히 개똥쑥의 주요 성분인 아테미시닌(artemisinin)과 그 유도체는 중국과 인도에서 열성 질환과 말라리아 치료제로 오래전부터 널리 사용되어 왔고 암세포에 대한 세포독성 효과를 갖고 있다.

[0003] 대한민국 공개특허 제2015-0087715호는 개똥쑥 추출물, 아테미시닌 또는 디히드로아테미시닌을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러나, 상기 선행기술의 경우, 충분한 유효성분 폴리페놀 혼합물 분석의 부재와 개똥쑥 추출물에서 분리한 조성물은 정상세포에서는 부작용이 없는 농도에서 암세포의 생육을 억제하기 위한 충분한 항암활성을 나타내지 않는 문제점이 있다.

[0005] 본 발명은 폴리페놀만을 추출함으로써 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 보다 항암활성이 증가된 개똥쑥 성분을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물로부터 분리된 폴리페놀 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물로부터 분리된 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 개선용 건강기능식품이 제공된다.

발명의 효과

[0008] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 개똥쑥으로부터 분리된 항암활성을 나타내는 유효성분을 포함하는 추출물을 이용하여 암 예방 또는 치료효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 개똥쑥 조직으로부터 유기용매를 이용하여 추출한 혼합물에서 HPLC-MS/MS 방법을 통해 다양한 종류의 폴리페놀을 확인한 그래프이다.

도 2는 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 항암 효과를 관찰하기 위하여 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231)와 인간 제대정맥 내피세포(ECs)의 세포 생존능을 분석한 그래프이다.

도 3은 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 A549 폐암 세포의 생존능을 분석한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 A549 폐암 세포의 사멸을 확인한 사진이다.

도 5는 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 U937 백혈병세포의 생존능을 분석한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231)와 인간 제대정맥 내피세포(ECs)의 유착(adhesion) 분석한 사진(A)이고 그래프(B)이다.

도 7은 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231) 형태의 변화를 나타낸 메트

리겔 침윤 분석 사진(A)이고 그래프(B)이다.

도 8은 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 확인하기 위한 젤라틴 자이모그래피 분석을 수행한 겔사진(A)이고 그래프(B)이다.

도 9는 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 EMT-관련 단백질(Snail, β -catenin, N-cadherin 및 E-cadherin)의 발현을 확인한 웨스턴 블랏 겔 사진이다.

도 10은 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 유착분자(VCAM-1 및 ICAM-1)의 발현을 확인한 웨스턴 블랏 겔사진과 그래프이다.

도 11은 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 Akt 및 PKC 발현을 관찰한 웨스턴 블랏 겔사진이다.

도 12는 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 A549 폐암 세포의 사멸을 관찰한 그래프이다.

도 13은 본 발명의 개똥쑥 추출물 pKAL 처리에 따른 세포사멸 유발인자의 발현을 관찰한 웨스턴 블랏 겔사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 용어의 정의:

[0011] 본 문서에서 사용되는 용어 "개똥쑥(*Artemisia annua* L. AA)"은 초롱꽃목 국화과의 한해살이 풀로 잔잎쑥○개똥쑥이라고도 한다. 높이 약 1m로 성장하며 길가나 빈터, 강가에서 자란다. 풀 전체에 털이 없고 특이한 냄새가 난고 줄기는 녹색으로 가지가 많이 갈라진다.

[0012] 본 문서에서 사용되는 용어 "상피간엽이행(epithelial??mesenchymal transition, EMT)"은 상피세포(epithelial cell)가 간엽세포(mesenchymal cell)의 모양과 특징으로 변화(간엽세포화)하는 현상으로 배아 발생, 상처 치유, 장기 섬유화, 암 전이에 중요한 기작이며 암 관련 상피간엽이행은 이동성과 침습성을 확보하기 위한 과정이면서 더 나아가, 상피 암세포의 대사 작용, 후성 유전, 분화에 있어 복잡하게 관여하는 포괄적인 리프로그래밍이 이루어지는 작업이라 할 수 있다.

[0013] 발명의 상세한 설명:

[0014] 본 발명의 일 관점에 따르면 개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물로부터 분리된 폴리페놀 혼합물을 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0015] 상기 조성물에 있어서, 상기 개똥쑥 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알콜, 주정 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조될 수 있다.

[0016] 상기 조성물에 있어서, 상기 폴리페놀 혼합물은 개똥쑥 조직을 파쇄하여 제조된 분말에 에탄올을 처리하여 추출하고 상기 추출물을 농축한 후 초산에틸로 추출함으로써 제조될 수 있고, 상기 초산에틸로 추출 과정은 2 내지 4회 반복될 수 있다.

[0017] 상기 조성물에 있어서, 상기 폴리페놀 혼합물은 카페산(caffeic acid), 퀘르세틴-3-O-갈락토시드(quercetin-3-O-galactoside), 메아르세틴-글루코시드(mearnsetin-glucoside), 캄페롤-3-O-글루코시드(kaempferol-3-O-glucoside), 퀘르세틴-3-O-글루코시드(quercetin-3-O-glucoside), 페룰산(ferulic acid), 이소람네티-글루코시드(isorhamnetin-glucoside), 디오스메틴-7-O-D-글루코시드(diosmetin-7-O-D-glucoside), 루테올린-7-O-글루코시드(luteolin-7-O-glucoside), 퀘르세틴(quercetin), 퀘르세틴-3-O-메틸 에테르(quercetagetin-3-O-methyl ether), 루테올린(luteolin), 8-메톡시-캄페롤(8-methoxy-kaempferol), 퀘르세타게틴-5,3-di-O-메틸 에테르(quercetagetin-5,3-di-O-methyl ether), 캄페롤(kaempferol), 3,5-디히드록시-6,7,4'-트리메톡시플라본(3,5-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone), 3,5-디히드록시-6,7,3',4'-테트라메톡시플라본(3,5-dihydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone) 및 이소람네티(isorhamnetin)를 포함할 수 있다.

[0018] 상기 조성물에 있어서, 상기 암은 자궁경부암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부 흑색종, 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 뇌종양, 방광암, 혈액암, 위암, 항문부근암, 유방암, 나팔관암종 또는 자궁내막암종일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물로부터 분리된 폴리페놀 화합물을 유효성분으로 함유하는, 암 예방 및 개선용 건강기능식품이 제공된다.

[0020] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 일 수 있다. 또한, 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있고 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 상기 부형제는 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.

[0021] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 0.01 내지 500mg/kg의 양, 바람직하게는 0.1 내지 100mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있고 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있으나 이에 한정된 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있고 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다

[0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0024] 실시예 1: 폴리페놀 화합물 추출

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따라 한국 개똥쑥으로부터 폴리페놀 혼합물(polyphenol from Korean *A. annua* L, 이하, 'pKAL'이라 약칭함)을 추출하였다.

[0026] 구체적으로, 개똥쑥 뿌리, 꽃, 잎 및 줄기가 포함된 개똥쑥(Korean *A. annua* L) 조직(100 g)을 과쇄하여 분말을 제조하였고 500 ml 70% 에탄올(ethanol)로 80℃에서 20시간 동안 추출하였다. 그 후, 고체를 여과하고 남은 용액을 100 ml로 농축한 후 초산 에틸(ethyl acetate) 200 ml를 가하여 잘 혼합한 후, 초산 에틸층을 회수하였다. 남은 물층에 대하여 연속으로 2회 초산 에틸 200 ml 추출을 한 후, 초산 에틸층을 혼합하여 용매를 증발시켜 초산 에틸 분획물을 제조하였다. 그런 다음 상기 초산 에틸 분획물에 대하여 종래의 HPLC-MS/MS 방법(Yun *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 48: 903-909, 2010)을 적용하여 상기 폴리페놀 혼합물을 용출시켰다. 용출된 폴리페놀 혼합물은 약 81 mg 정도였고(수율 0.081%), 상기 폴리페놀 혼합물에 대하여 MS/MS 분석을 수행한 결과 총 19가지 종류의 폴리페놀을 검출할 수 있었으며, 이는 하기 표 1과 같다:

표 1

폴리페놀	M-H	MS/MS
Caffeic acid (1)	179	179 135
Quercetin-3-O-galactoside (5)	463	463 301 175 151 121
Mearnsetin-glucoside (7)	493	493 331 315 287 270 181
Kaempferol-3-O-glucoside (8)	447	447 285
Quercetin-3-O-glucoside (9)	463	301 300 178 175 151 121 107
Mearnsetin-glucoside (10)	493	493 331 315 287 270 181
Ferulic acid (12)	193	193 178 161 149 134
Isorhamnetin-glucoside(14)	477	477 462 446 315 314 313 300 299 287 271
Diosmetin-7-O-d-glucoside (15)	461	461 341 299
Luteolin-7-O-glucoside (16)	447	447 285 255 227
Quercetin (22)	301	301 273 179 151 121 107
Quercetagenin-3-O-methyl ether (24)	331	331 316 287 271 209 151 179 166
Luteolin (26)	285	285 243 241 217 198 175 151 133
8-methoxy-kaempferol(27)	315	315 300 285 137

quercetagetin-5,3-di-O-methyl ether(28)	345	345 330 315 287
Kaempferol (30)	285	285 217 151 133
3,5-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone (31)	359	359 344 329 314 301 286
3,5-dihydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone (32)	373	373 358 343 328 315 299 285
Isorhamnetin (33)	315	315 300 271 247 203

[0028] 종래 개똥썩으로부터 분리된 폴리페놀 혼합물에 포함된 폴리페놀과 본 실시예를 통해 분리된 폴리페놀은 모두 33 종류로 이는 하기와 같다:

[0029] 카페산(caffeic acid, 1), 시링가알데하이드(syringic aldehyde, 2), 디카페올리니퀴닉산 이성질체(dicaffeoylquinic acid isomer, 3, 4, 11), 퀘르세틴 3-O-갈락토시드(quercetin 3-O-galactoside, 5), 디카페올리니퀴닉산 이성질체(dicaffeoylquinic acid isomer, 6), 메안세틴3-O-헥소사이드 이성질체(mearnsetin 3-O-hexoside isomer, 7, 10), 캄페롤 3-O-글루코사이드(kaempferol 3-O-glucoside, 8), 퀘르세틴 3-O-글루코사이드(quercetin 3-O-glucoside, 9), 페룰산(ferulic acid, 12), 카페올리페롤올리니퀴닉산 이성질체(caffeoylferuloylquinic acid isomer, 13, 17-19), 이소람네틴 3-O-글루코시드(isorhamnetin 3-O-glucoside, 14), 디오스메틴 7-O-글루코사이드(diosmetin 7-O-glucoside, 15), 루테올린 7-O-글루코사이드(luteolin 7-O-glucoside, 16), 디페롤올리니퀴닉산(diferuloylquinic acid, 21), 퀘르세틴(quercetin, 22), 디카페올리페롤올리니퀴닉산 이성질체(dicaffeoylferuloylquinic acid isomer, 23), 3-O-메틸퀘르세타게틴(3-O-methylquercetagetin, 24), 디카페올리페롤올리니퀴닉산 이성질체(dicaffeoylferuloylquinic acid isomer, 25), 루테올린(26), 8-메톡시캄페롤(8-methoxykaempferol, 27), 3,5-디메토시퀘르세타게틴(3,5-dimethoxyquercetagetin, 28), 카페올리디페롤올리니퀴닉산(caffeoyldiferuloylquinic acid, 29), 캄페롤(kaempferol, 30), 3,5-디히드록시-6,7,4'-트리메토시플라본(3,5-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone, 31), 3,5-디하이드록시-6,7,3',4'-테트라메토시플라본(3,5-dihydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone, 32) 및 이소람네틴(isorhamnetin, 33).

[0030] 상기 동정된 폴리페놀 중 퀘르세틴과 캄페롤 유도체는 총 폴리페놀의 84.8%를 차지하였고 12 종류의 히드록시신남산(hydroxycinnamic acids, 1, 3, 4, 6, 11, 13, 17??19, 21, 23 및 25)과 10종류의 플라보노이드(7, 9, 10, 14, 16, 22, 26, 및 30??32)는 종래 중국, 브라질 및 이탈리아 개똥썩에서 동정되어 보고된 바 있으며 나머지 히드록시신남산과 플라보노이드는 본 실험의 개똥썩 조직에서 처음으로 동정되었고 일부는 검출되지 않았다(도 1). 상기 추출한 폴리페놀 혼합물 내의 폴리페놀 함량을 하기 표 2에 표시하였다.

표 2

[0031]

폴리페놀	함량(mg/kg)	폴리페놀	함량(mg/kg)
1	27.9±0.8	18	ND
2	ND	19	ND
3	ND	20	ND
4	ND	21	ND
5	79.6±2.7	22	40.8±0.5
6	ND	23	ND
7	81.7±0.6	24	38.4±0.5
8	8.0±0.2	25	ND
9	9.3±0.4	26	54.8±0.4
10	12.4±0.2	27	13.7±0.5
11	ND	28	15.6±0.2
12	73.7±1.0	29	ND
13	ND	30	29.1±0.9
14	10.9±0.7	31	64.0±1.3
15	8.9±0.1	32	225.8±1.4
16	12.7±0.4	33	3.4±0.1
17	ND		
총합량	810.7±0.2		

[0032] 실시예 2: 세포배양 및 시약

[0033] 본 발명의 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231), 폐암 세포주(A549) 및 U937 백혈병세포주(leukemic cell)는 한국 세포주 은행 또는 ATCC에서 구매하였고 상기 세포주는 10% 우태아혈청(FBS, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), 2 mM L-글루타민, 25 mM의 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 25 mM NaHCO₃, 100 IU/ml 페니실린 및 10 µg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 또한 인간 제대정맥 내피세포(EA.hy 926 cells, EC)는 ATCC에서 구입하여 20% FBS, 2 mM L-글루타민, 5 U/ml 헤파린, 100 IU/ml 페니실린, 10 µg/ml 스트렙토마이신 및 50 µg/ml EC 성장 보조제(growth supplements)가 첨가된 199 배지(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 그 후, 상기 세포들은 95% 가습 대기 환경과 5% CO₂ 조건으로 100 mm 배양접시에서 배양하였다. 아울러, VCAM-1, ICAM-1, Snail, N-cadherin, E-cadherin, Akt, PKC, p53, PARP, Caspase-3, cleaved Caspase-3, LC-3, Mcl-1, BAX 및 β-catenin에 대한 항체는 Santa Cruz 생명공학회사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구매하였고 phospho-Akt 및 phospho-PKC에 대한 항체는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 또한, 재조합 종양괴사인자(TNF)는 R&D 시스템(Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였고 Matrigel™ 기저막 매트릭스(basement membrane matrix)는 BD Biosciences(San Diego, CA, USA), 강화된 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 웨스턴 블랏 탐지 시약은 Amersham(Buckinghamshire, UK), β-액틴을 포함한 다른 모든 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

[0034] **실시예 3: 세포 생존능 분석(MTT assay)**

[0035] 본 발명의 일 실시예에 따라 pKAL 처리에 따른 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231), 인간 제대정맥 내피세포(ECs), 폐암 세포주(A549) 및 U937 백혈병세포(leukemic cell)의 세포 생존능을 분석하였다.

[0036] 먼저, 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 인간 제대정맥 내피세포(ECs)는 24-웰 플레이트에 상기 세포를 웰당 10⁴ 세포를 파종하였고 pKAL을 1, 10, 50 및 100 µg/ml의 농도 조건으로 24시간 동안 처리하였다. 또한 폐암 세포주(A549)는 pKAL을 1, 5, 10 및 50 µg/ml의 농도 조건으로 24시간 및 48시간 동안 처리하였고 U937 백혈병세포(leukemic cell)는 pKAL을 1, 2, 5, 10, 20, 50 및 100 µg/ml의 농도 조건으로 24시간 및 48시간 동안 처리하였으며 5 mg/ml MTT 수용액 50 µl를 각 웰에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 그 후, 상층액을 제거하고 포르마잔 결정(formazan crystals)을 각 웰에서 4 N HCl-isopropanol 200 µl를 이용하여 용해하였고 흡광도(absorbance)는 Infinite 200 microplate reader(TECAN Austria GmbH, Grödig, Austria)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 또한 A549 폐암 세포는 카메라(Nikon, DS-U3)가 장착된 올림푸스 현미경(CKX41)을 이용하여 이미지를 촬영하였다.

[0037] 그 결과, pKAL의 처리로 MDA-MB-231 유방암 세포의 생존능은 농도 의존적으로 억제되었으나 인간 제대정맥 내피세포(ECs)에서는 pKAL의 농도가 100 µg/ml가 될 때 까지 생존능이 감소하지 않았다(도 2). 또한, A549 폐암 세포의 생존능은 pKAL의 처리에 따라 농도 의존적으로 억제되었고 pKAL의 용량 증가 시 세포사(cell death)를 유발하는 것을 확인하였다(도 3 및 4). 아울러, U937 백혈병세포(leukemic cell)에서도 농도 의존적으로 생존능이 억제되는 것을 확인하였다(도 5). 이러한 결과는 pKAL이 정상세포에서 최소 독성을 갖는 항암제로서 작용할 수 있는 암-특이적 독성을 가지고 있음을 말해준다.

[0038] **실시예 4: 유착 분석(adhesion assay)**

[0039] 본 발명의 일 실시예에 따라 pKAL 처리에 따른 MDA-MB-231 세포와 ECs의 유착 분석을 수행하였다.

[0040] 구체적으로, ECs 및 MDA-MB-231 세포에 pKAL(1 - 30 µg/ml)를 24시간 동안 처리한 후 TNF(10 ng/ml)를 6시간 동안 처리하였다. 이어서, 상기 처리된 MDA-MB-231 세포(7.5 X 10⁵ 세포/ml)를 37°C 조건에서 상기 ECs에 첨가하였다. 30분 경과 후, 세포 현탁액을 회수하고 상기 ECs는 PBS로 3회 세척하였으며 MDA-MB-231 세포는 광학현미경 하에서 계수하였고 카메라(Nikon, DS-U3)가 장착된 올림푸스 현미경(CKX41)을 이용하여 이미지를 촬영하였다.

[0041] 그 결과, 대조군과 비교하여 ECs와 MDA-MB-231 유방암 세포의 유착이 6시간 TNF 처리에 의해 급격하게 증가하였고(도 6A) ECs에 대한 TNF-유도 MDA-MB-231 유방암 세포의 유착은 항-유착효과를 가지고 있는 pKAL 처리에 의해 상당히 억제됨을 확인하였다(도 6B). 이러한 결과는 pKAL이 정상세포에 최소 독성을 가지고 있는 암전이(metastasis)를 억제하는 치료제로서 작용할 수 있음을 말해준다.

[0042] **실시예 5: 매트릭셀 침윤 분석(matrigel invasion assay)**

[0043] 본 발명의 일 실시예에 따라 pKAL 처리에 따른 MDA-MB-231 세포 형태의 변화를 매트릭셀 침윤 분석을 통해 관찰하였다.

- [0044] 구체적으로, pKAL(1 - 30 $\mu\text{g/ml}$)을 MDA-MB-231 세포에 1시간동안 전처리 후 TNF(10 ng/ml)를 6시간동안 처리하였고 현미경($\times 400$)으로 세포 형태의 변화를 관찰하였다. 또한 상기 세포를 회수하여 매트릭셀이 코팅된 삽입웰에 적용 후 37°C에서 16시간동안 배양하여 매트릭셀 침윤 분석을 수행하였다. ECs는 pKAL을 24시간동안 전처리하고 PBS로 3회 세척하였고 TNF를 EC-코팅 매트릭셀에 6시간동안 처리하였다. 또한 MDA-MB-231 세포를 EC-코팅 매트릭셀 웰에 첨가하고 24시간 동안 배양하였고 비 침습세포(non-invasive cells)는 매트릭셀 멤브레인을 제거한 상부에 방치하였다. 그 후, 매트릭셀 막 하부의 세포를 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)로 염색하였고 멤브레인을 통해 침습 세포의 수를 형광현미경을 이용하여 계수하였다.
- [0045] pKAL처리에 의한 스핀들(간엽)로부터 MDA-MB-231 세포의 형태적 변화를 관찰한 결과, 농도 의존적으로 라운드형(상피)을 형성하였다(도 7A). TNF에 의한 MDA-MB-231 세포 침습 활성화를 pKAL이 억제할 수 있는지 여부를 관찰한 결과, TNF는 농도 의존적으로 pKAL 처리에 의해 급격하게 억제된 암세포 침습을 상당히 증가시키는 것으로 나타났다(도 7B). 이러한 결과는 pKAL 처리가 EMT의 억제를 통해 암세포의 침습을 억제한다는 것을 의미한다.
- [0046] **실시예 6: 젤라틴 자이모그래피(gelatin zymography)**
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 따라 MMP-2(gelatinase-A) 및 MMP-9(gelatinase-B)의 발현을 확인하기 위해 젤라틴 자이모그래피 분석을 수행하였다.
- [0048] 구체적으로, MDA-MB-231 세포를 5×10^4 cells/ml의 농도로 파종하였고 pKAL을 1시간 동안 전처리한 후 TNF(10 ng/ml)를 12시간 동안 추가적으로 처리하였다. 또한 배양 배지에서 분비된 MMP-2 및 MMP-9에 대한 젤라틴용해성 활성(gelatinolytic activities)은 4°C에서 젤라틴(1 mg/ml)을 포함하는 8% 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 전기영동으로 측정하였고 배양액은 피어스 단백질 농축기 7 ml/9K, MWC0 장비(Thermo, Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 농축하였으며 배지 내 단백질은 80% 알코올 아세톤으로 침전시킨 후 샘플 버퍼(0.03% 브롬페놀 블루, 0.4 M Tris-HCl pH 7.4, 20% 글리세롤 및 5% SDS)와 혼합하였으며 젤라틴이 포함된 8% SDS-폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 분리하였다. 이어서, 상기 겔을 재생 버퍼(renaturing buffer, 2.5% Triton X-100)로 1시간 동안 세척한 후, 발현 버퍼(developing buffer, 50 mM Tris, 20 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.02% Brij35, pH 7.5)에서 37°C조건으로 24시간 동안 배양하였다. 그 후 상기 겔을 0.05% 코마시 브릴리언트 블루 R-250로 염색하였고 50% 메탄올 및 10% 아세트산으로 탈색(destained)하였으며 코마시 브릴리언트 블루 염색으로 젤라틴 분해(gelatin degradation)를 나타내는 흰색 용해 영역(white lysis zones)을 확인하였다.
- [0049] 그 결과, pKAL의 처리는 분비된 MMPs(matrix metalloproteinases)의 발현을 억제하는 것으로 나타났다(도 8).
- [0050] **실시예 7: 웨스턴 블랏 분석**
- [0051] 본 발명의 일 실시예에 따라 MDA-MB-231 유방암 세포 및 ECs에 pKAL 처리에 따른 EMT-관련 단백질(Snail, β -catenin, N-cadherin 및 E-cadherin)의 발현과 유착분자(VCAM-1 및 ICAM-1)의 발현을 관찰하기 위해 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.
- [0052] 구체적으로, MDA-MB-231 유방암 세포는 pKAL(1 - 30 $\mu\text{g/ml}$)을 6시간동안 처리하였고 MDA-MB-231 유방암 세포 또는 ECs에 pKAL을 1시간 처리 후 TNF(10 ng/ml)를 6시간동안 처리하였다. 그 후, 상기 세포를 PRO-PREP 단백질 추출 수용액(iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)을 이용하여 용해시켰고 조건 배양액(conditioned media, CM)의 단백질은 피어스 농축기 7 ml/9K, MWC0 장비(Thermo, Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 20배 농축하였다. 상기 농축된 단백질은 BioRad 단백질 분석(BioRad Lab., Hercules, CA, USA)으로 정량화하였고 상기 단백질의 50 μg 부분 표본을 이용하여 7.5-12.5% 도데실황산나트륨 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 수행하였으며 Hybond-P+ 폴리비닐리덴 다이플루오라이드 멤브레인(Amersham Biosciences UK Ltd)으로 전이하였다. 상기 멤브레인은 2차 항체가 결합된 고추냉이 퍼옥시다아제를 처리한 후 지정된 1차 항체와 함께 배양하였고 ECL 검측 시스템을 이용하여 블랏(blot)을 확인하였으며 β -액틴은 대조군 단백질(loading control)로 사용하였다.
- [0053] 그 결과, pKAL의 처리에 간엽 마커(mesenchymal markers)인 Snail과 N-cadherin의 발현은 급격하게 감소하였으나 β -catenin 및 E-cadherin의 발현은 감소하지 않은 것으로 나타났다(도 9). 이러한 결과는 pKAL의 처리가 간엽 마커 특히, N-cadherin의 하향조절로 인해 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 것을 의미한다. 또한, pKAL의 처리는 유착분자인 VCAM-1의 발현을 급격하게 억제하였으나 ICAM-1의 발현은 억제하지 못하는 것으로 나타났고(도 10A), TNF-유도 VCAM-1의 발현을 상당히 억제하였으나 MDA-MB-231 세포 및 ECs에서 TNF-유도 ICAM-1의 발현은 억제하지 못하는 것으로 나타났다(도 10B 및 10C). 이러한 결과는 pKAL가 암세포와 ECs에서 VCAM-1의 발현을 감소시키는 항-유착 효과가 있음을 말해준다.

[0054] **실시예 8: Akt 및 PKC 발현**

[0055] 본 발명의 일 실시예에 따라 pKAL 처리에 따른 상류 신호전달 경로(upstream signaling pathways)를 연구하기 위해 Akt 및 PKC 발현을 관찰하였다. 구체적으로, pKAL를 MDA-MB-231 세포 및 ECs에 1시간 동안 전처리 하고 TNF를 6시간 동안 처리하였다. 그 후 전체 세포 용해물(whole-cell lysate) 30 μ g을 이용하여 phospho-Akt, Akt, phospho-PKC, PKC, N-cadherin 및 E-cadherin의 발현을 웨스턴 블랏 분석을 통해 확인하였다.

[0056] 그 결과, pKAL의 처리에 의해 Akt의 인산화는 농도 의존적으로 억제되었으나 PKC의 인산화는 농도 의존적으로 증가되었고(도 11A) pKAL의 처리 후 TNF에 의해 활성화된 MDA-MB-231 세포 및 ECs에서의 p-Akt 및 p-PKC 발현을 관찰한 결과, TNF의 처리는 MDA-MB-231세포에서 Akt의 인산화를 급격하게 증가시켰으나 PKC의 인산화를 억제하는 것으로 나타났다(도 11B). 그러나 ECs에서 TNF의 처리는 Akt 및 PKC의 인산화를 급격하게 증가시켰고 pKAL의 처리는 Akt의 인산화를 억제시켰으나 PKC의 인산화는 억제시키지 못하는 것으로 나타났다(도 11C). 따라서 Akt 전달경로는 pKAL-유도 항암 효과와 관련된 주요 상류 신호전달 경로로서의 역할을 한다는 것을 의미한다.

[0057] **실시예 9: 세포사멸 유발**

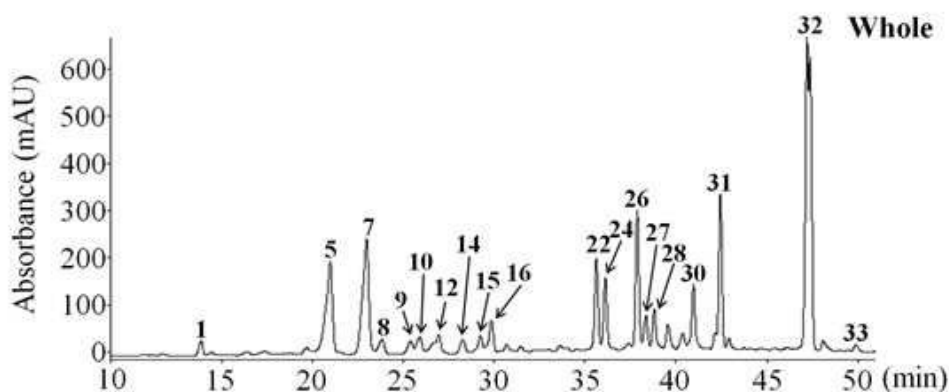
[0058] 본 발명의 일 실시예에 따라 pKAL의 처리에 따른 A549 폐암 세포의 사멸을 확인하였다. 먼저, A549 폐암 세포에 pKAL(10 μ g/ml)을 48시간 동안 처리한 후 PBS로 3회 세척하였으며 상기 세포를 Annexin V-PI 이중 염색(double staining) 후 유세포분석기(flow cytometry)로 측정하였다. 또한 세포사멸 유발 검증 및 기전을 확인하기 위하여 A549 폐암 세포에 pKAL(1, 5, 10 및 50 μ g/ml)을 24시간 처리하고 웨스턴 블랏 분석을 통해 세포사멸 유발인자(p53, PARP, Caspase-3, cleaved Caspase-3, LC-3, Mcl-1, BAX)의 발현을 관찰하였다.

[0059] 그 결과, pKAL의 처리시간이 증가함에 따라 A549 폐암 세포의 사멸이 증가하는 것으로 나타났고(도 12) 세포사멸 유발인자의 발현은 pKAL의 처리에 따라 농도 의존적으로 상향 조절되면 억제인자는 하향 조절되는 것을 확인하였다(도 13).

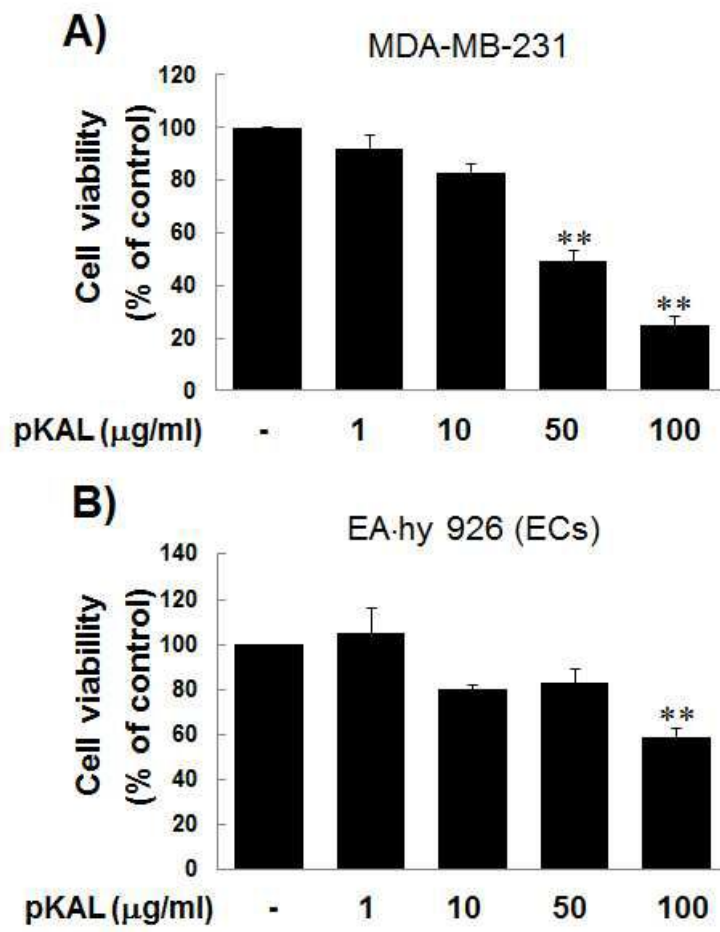
[0060] 본 발명은 상술한 실시 예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

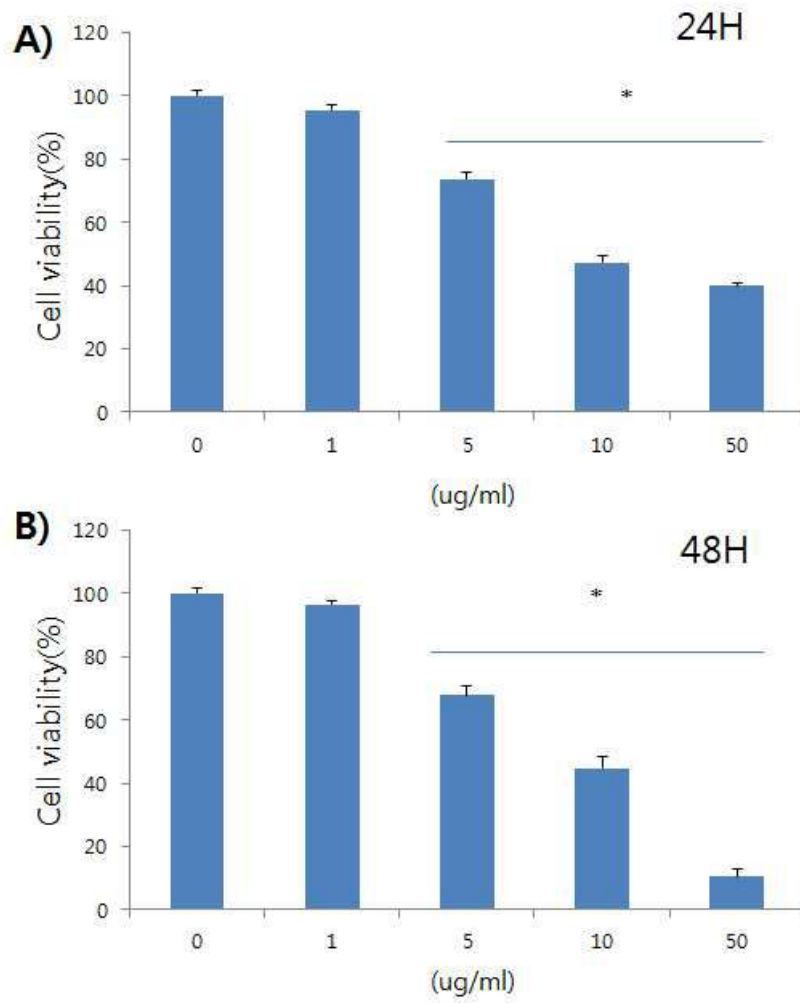
도면1



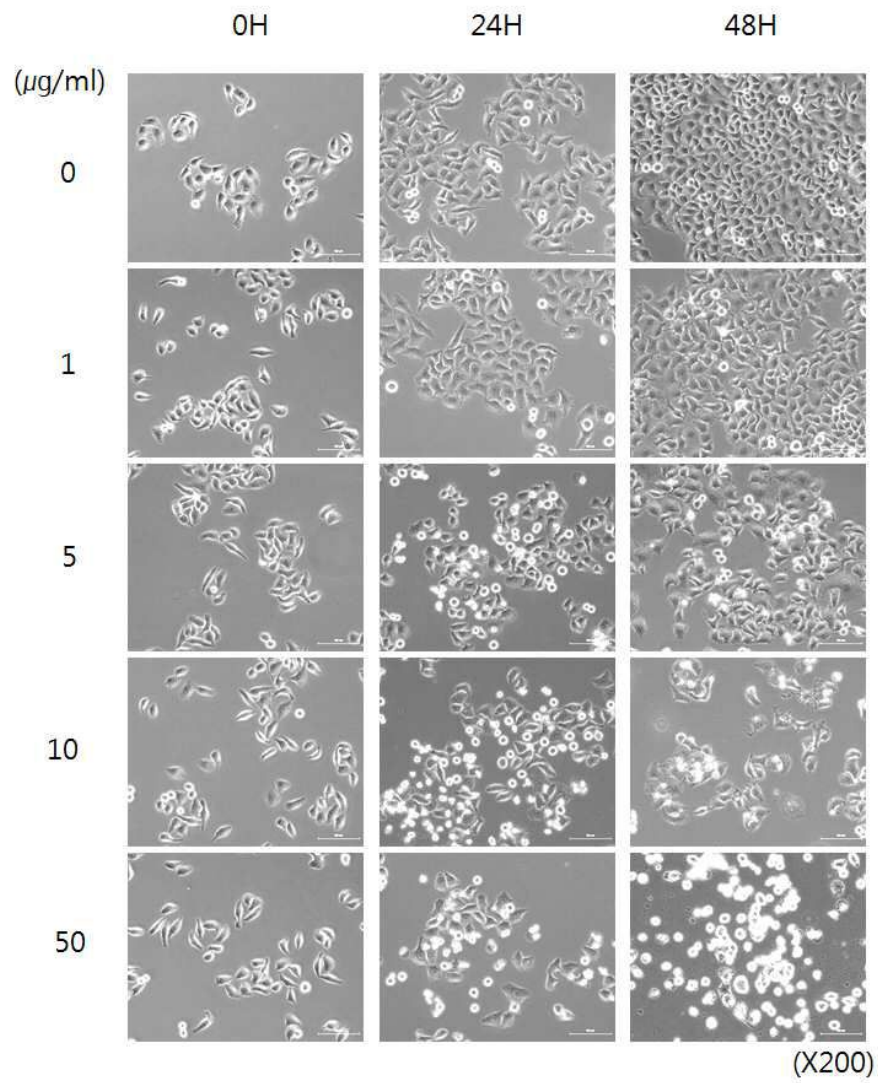
도면2



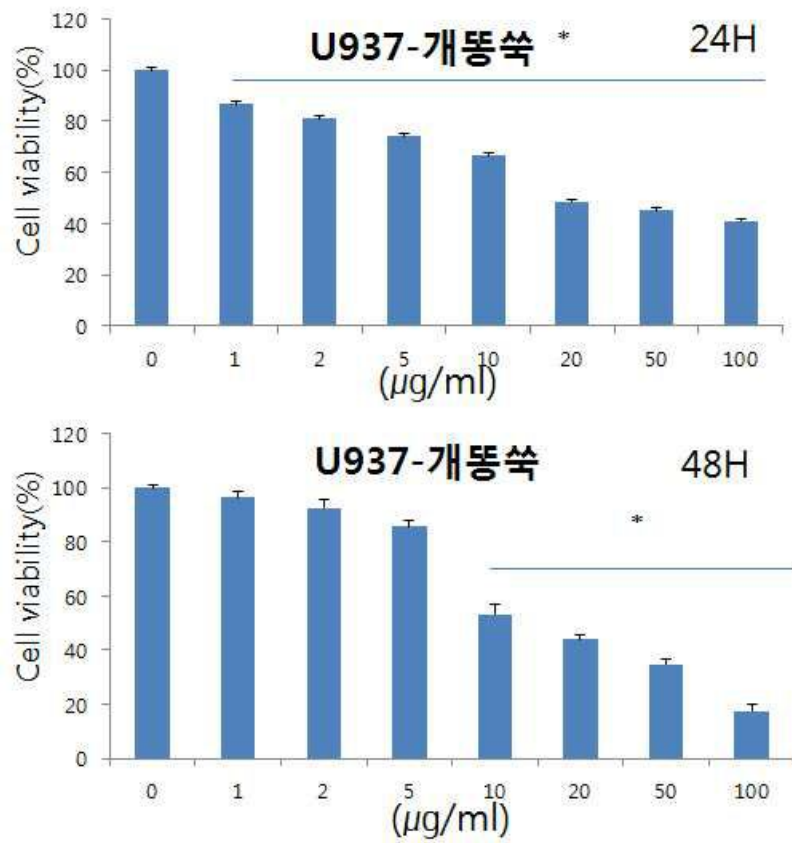
도면3



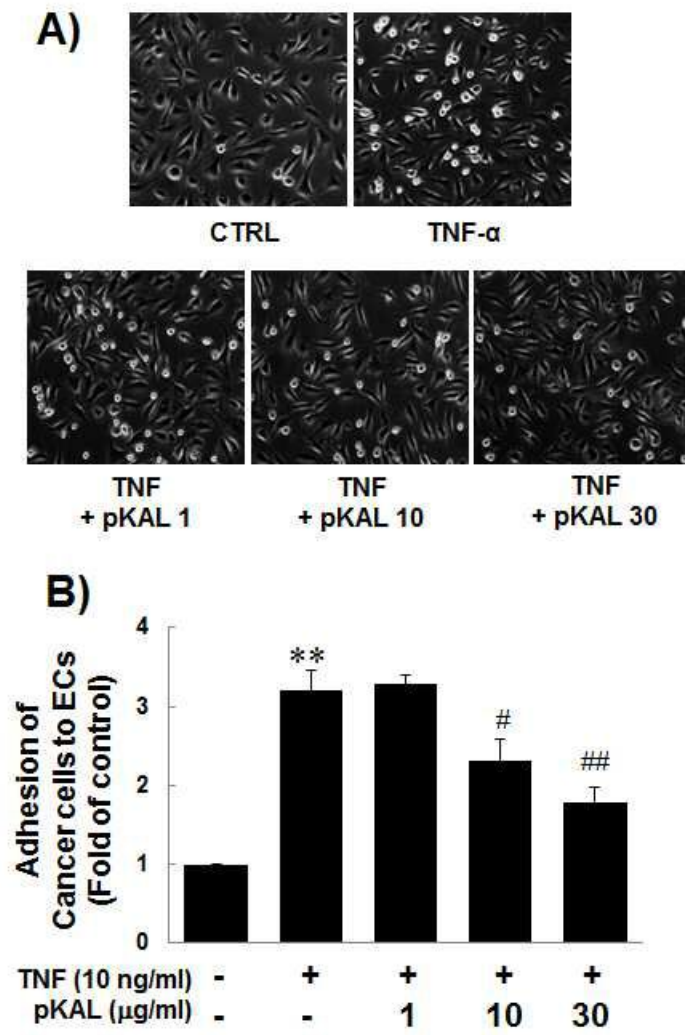
도면4



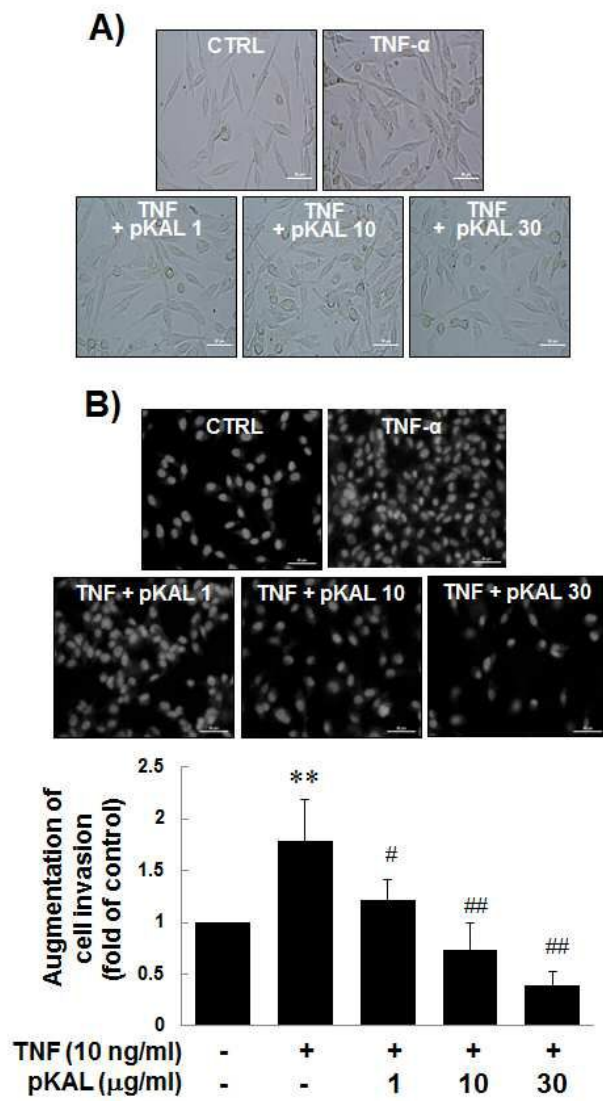
도면5



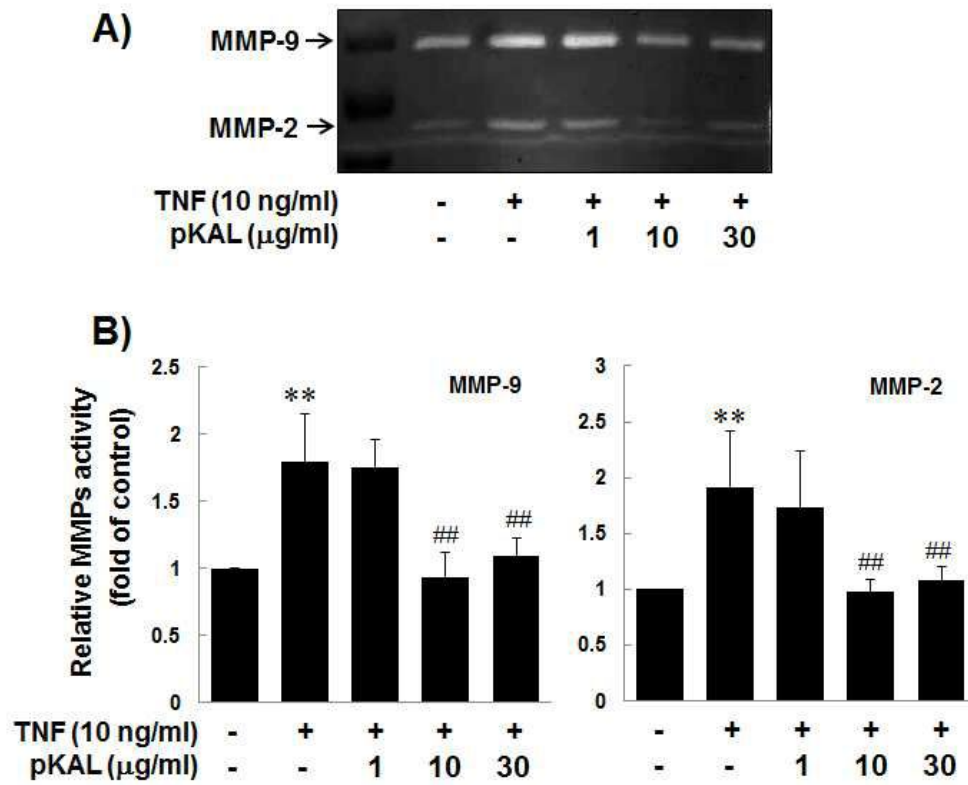
도면6



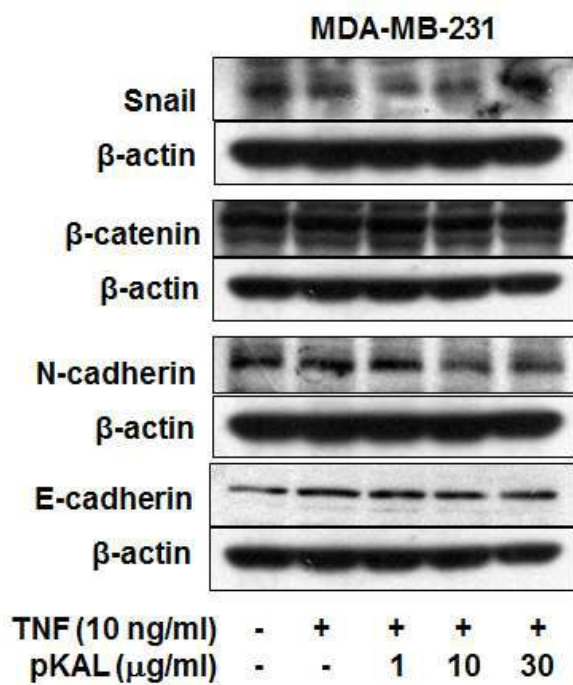
도면7



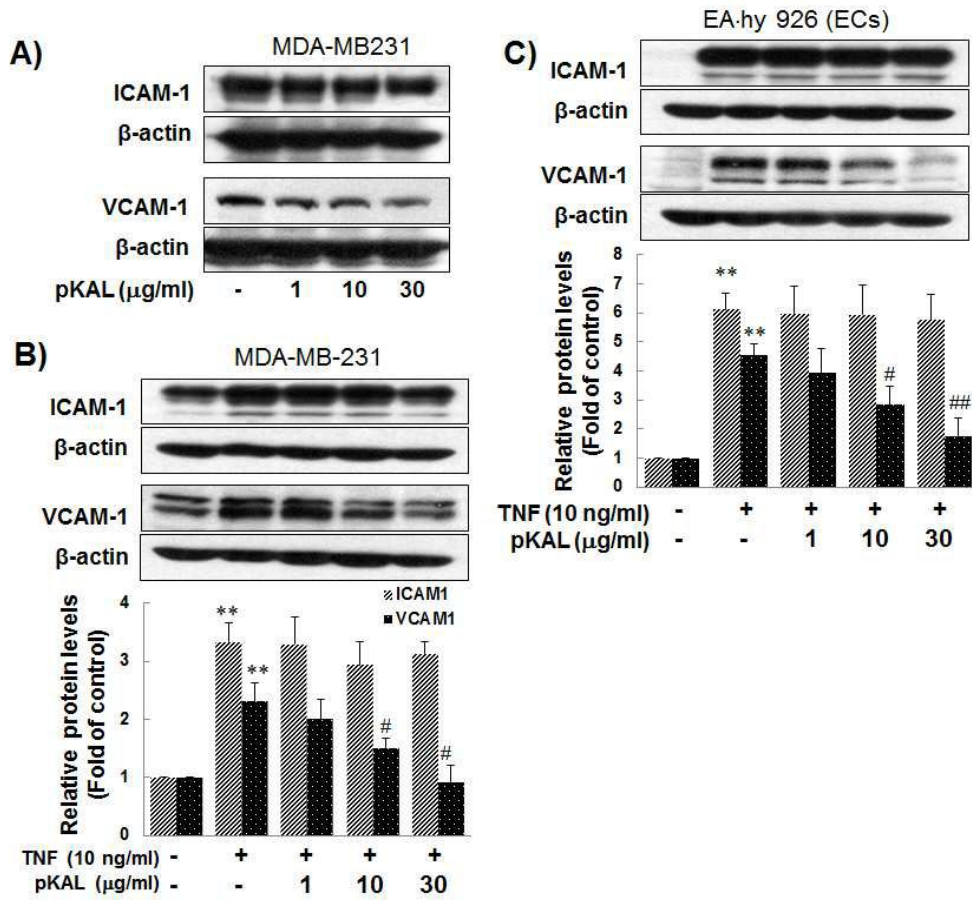
도면8



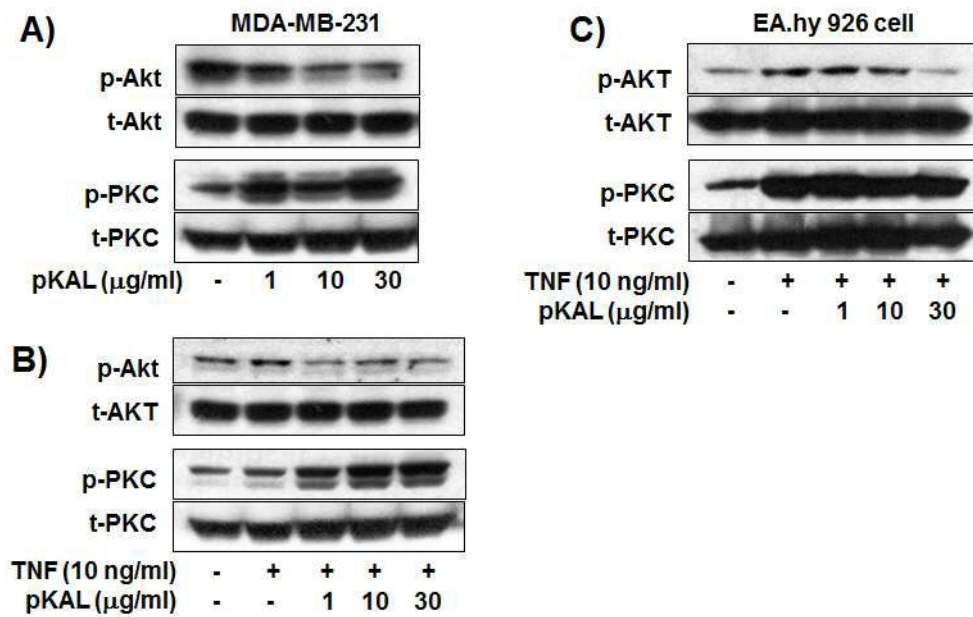
도면9



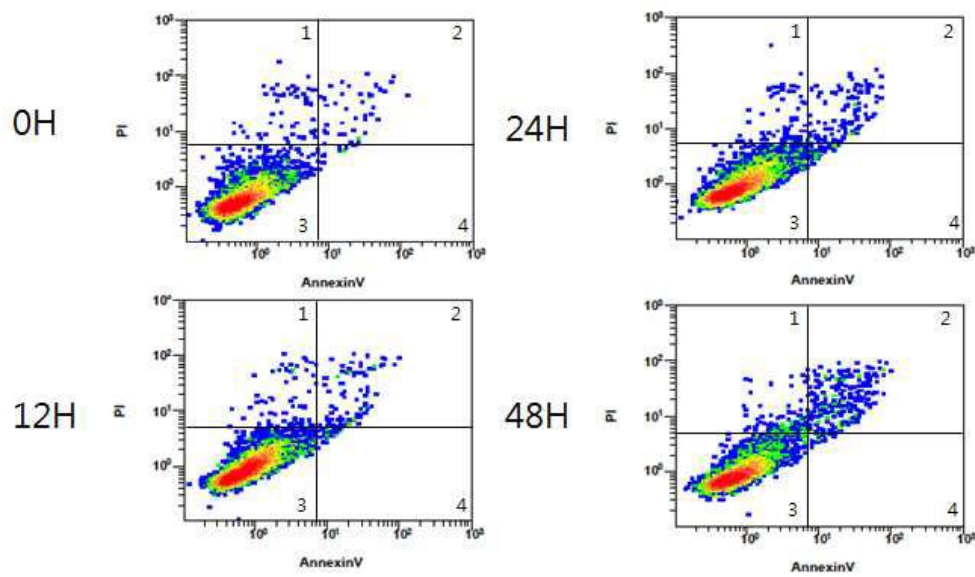
도면10



도면11



도면12



도면13

